



Rapport de mission à Madagascar

N° 9.035 / UMR15

Appui à la mise en place d'un réseau de surveillance de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle dans la région du lac Alaotra

Renaud Lancelot (CIRAD, UMR 15)
Virginie Michel (AFSSA, UR EBEAC)
Dr Rakotondravao (FOFIFA, DRZV)

Novembre 2009

Sommaire

1. Objectifs	3
2. Résultats des discussions et visites de terrain	3
2.1. Information des partenaires	3
2.2. Appui méthodologique	5
2.2.1. Surveillance des foyers de pestes aviaires.....	5
2.2.1.1. Objectifs	5
2.2.1.2. Définition des suspicions d'IA ou de MN.....	5
2.2.1.3. Déclaration des foyers	6
2.2.1.4. Suivi des « foyers <i>a priori</i> ».....	7
2.2.1.5. Echantillonnage des foyers.....	8
2.2.1.6. Analyses de laboratoire	9
2.2.1.7. Gestion et traitements des données	10
2.2.2. Animation du réseau / formation / restitution	10
2.2.3. Biosécurité.....	10
2.2.3.1. Prévention de la dissémination des agents pathogènes	10
2.2.3.2. Qualité des prélèvements	11
2.2.3.3. Sécurité des personnes	11
2.2.4. Identification des circulations virales à bas bruit	11
2.3. Sujet possible de collaboration CIRAD-AFSSA-FOFIFA sur l'épidémiologie des pestes aviaires à Madagascar.....	13
3. Annexes	14
3.1. Déroulement de la mission	14
3.2. Liste des personnes rencontrées	14
3.2.1. Antananarivo	14
3.2.2. Ambatondrazaka.....	14

1. Objectifs

La mission a été effectuée à Madagascar du 01 au 07/11/2009 par R. Lancelot, épidémiologiste du CIRAD (UMR15 Contrôle des maladies) et V. Michel, épidémiologiste de l'AFSSA (UR EBEAC, Ploufragan). Ils ont été accompagnés pendant toute la durée de leurs visites à Antananarivo et au lac Alaotra par le Dr Rakotondravao, directeur du département DRZV du FOFIFA. Les objectifs étaient de :

- Informer les partenaires malgaches dans le domaine de la santé animale sur l'état d'avancement des deux thèses d'université en cours au DRZV concernant les pestes aviaires (maladie de Newcastle – MN – et influenza aviaire – IA) et encadrées par le CIRAD (UMR15 et UR22). Les deux thèses sont réalisées par :
 - Harentsoaniaina Rasamoelina Andriamanivo (Harena) : épidémiologie des pestes aviaires
 - Fridolin Maminiaina : virologie des pestes aviaires
- Plus généralement, il s'agissait de nous informer mutuellement sur les activités en cours et prévues, dans la perspective de la visite en mars 2010 de D. Martinez, directeur de l'UMR15 et E. Albina, chef de l'équipe de virologie de cette UMR.
- Apporter un appui méthodologique à la thèse d'Harena, co-encadrée par R. Lancelot (UMR15) et V. Chevalier (UR22) et discuter les éléments permettant de finaliser un protocole de surveillance épidémiologique des pestes aviaires dans la région du lac Alaotra.
- Identifier un sujet de recherche AFSSA-CIRAD-FOFIFA susceptible de donner lieu à une thèse d'épidémiologie cofinancée AFSSA-CIRAD, en collaboration avec les partenaires malgaches dans le domaine de la santé animale.

Le déroulement de la mission et la liste des personnes rencontrées figurent en annexe.

2. Résultats des discussions et visites de terrain

2.1. Information des partenaires

Les travaux de thèse d'Harena et de Fridolin ont été présentés au cours d'une réunion rassemblant le FOFIFA, les services vétérinaires, l'ordre des vétérinaires et le CIRAD. Nous avons précisé que ces résultats étaient partiels et que d'autres activités étaient réalisées sur les pestes aviaires, notamment dans le cadre des projets FSP GripAvi et FCT AnimalRisk (CRVOI). Elles feront l'objet de restitutions plus détaillées que lors de cette réunion.

Tous les partenaires malgaches se sont félicités de l'évolution positive du volume et de la qualité des travaux en santé animale depuis ces dernières années. Beaucoup de questions ont porté sur la signification des résultats présentés, notamment au sujet du « nouveau » génotype du virus de la MN. Nous avons indiqué que ces résultats étaient préliminaires. Les travaux de caractérisation de la pathogénicité des virus isolés, les résultats des enquêtes effectuées en mai 2009 au lac Alaotra, et ceux liés à la mise en place d'une surveillance de la MN et de l'IA dans cette même région apporteront un éclairage complémentaire. **Ce n'est qu'à l'issue de ces travaux que des conclusions et recommandations précises pourront être formulées.**

Des restitutions des résultats sont toutefois souhaitées par les partenaires malgaches sur les travaux en cours ou terminés, particulièrement ceux concernant la filière porcine : peste porcine africaine (projet Wellcome Trust) et influenza. Elles faciliteraient la poursuite des activités de recherche dans ce domaine ainsi que dans le secteur aviaire, notamment dans le bassin de production de Mahitsi. **Il est souhaitable que le temps et les moyens nécessaires soient consacrés à diffuser et expliquer les résultats obtenus dans les différents projets.**

Lors de la visite de terrain au lac Alaotra, l'information a été focalisée sur la mise en place du réseau de surveillance de l'IA et de la MN. La mise en place de ce réseau est en préparation depuis plusieurs mois et a l'affectation de M. Jourdan (VI de l'UR 22) à Ambatondrazaka est intervenue dans ce cadre. L'accueil des partenaires vis-à-vis de cette initiative est très bon, tant au niveau des ACSA, que de celui des vétérinaires sanitaires ou des services vétérinaires régionaux. Les intervenants ont exprimé des attentes fortes en matière de restitution des résultats à venir, de séances de formation pour acquérir les connaissances de base sur les maladies surveillées, les techniques d'examen clinique, d'autopsie et de prélèvements, mais aussi de manière plus générale sur les dominantes pathologiques et les bonnes pratiques sanitaires en aviculture villageoise. Il sera important de répondre à ces attentes au démarrage et pendant le fonctionnement du réseau, tout en veillant à diffuser des messages adaptés au niveau des intervenants et respectant les règles déontologiques : programme et contenu des formations à définir en concertation avec les services vétérinaires et l'ordre des vétérinaires. Une collaboration avec ces partenaires ainsi qu'AVSF (présent à Ambatondrazaka et assurant la formation des ACSA), sera à envisager à cet égard, au-delà des partenariats déjà installés.

Les actions effectuées en partenariat et le comportement des agents CIRAD, en poste ou en mission, sont perçus de manière très positive. Le Dr Rakotondravao a souligné l'excellente collaboration instaurée avec F. Stachurski, acarologue de l'UMR15 affecté au DRZV. Les excellentes qualités relationnelles et professionnelles de M. Jourdan ont été mentionnées par le Dr Rakotondravao et tous les partenaires ayant eu l'occasion de travailler avec elle. Les services vétérinaires régionaux et nationaux n'étaient toutefois pas informés de sa présence à Ambatondrazaka et de son rôle dans le dispositif de recherche en santé animale. Ils ont souligné la nécessité d'être impliqués dans tous les aspects de la surveillance IA et MN.

Le FOFIFA (direction scientifique et DRZV) souhaite une concertation sur les affectations à venir des agents du CIRAD, notamment M. Pedrono et L. Guerrini (UR22). Le DRZV a également soulevé la question du lieu d'affectation de ces deux agents (Ambatobe vs. Ampandrianomby), tout en soulignant que plus que le lieu lui-même, l'important était la programmation et la coordination des activités de ces agents dans un cadre de partenariat CIRAD-DRZV. Cette vision est partagée par la DS du FOFIFA et la DR du CIRAD à Madagascar.

2.2. Appui méthodologique

Dans le cadre des travaux de recherche écologique, épidémiologique et virologique entrepris à l'occasion du FSP Gripavi, le dispositif de surveillance des pestes aviaires s'appuie sur deux activités : (i) la surveillance des foyers cliniques de pestes aviaires, et (ii) l'identification des circulations virales à bas bruit à l'aide d'une enquête prospective stratifiée. Ces activités débuteraient en novembre 2009 pour se terminer en mai 2010, date officielle de clôture du projet. Cependant, une extension sans coût supplémentaire sera vraisemblablement demandée au MAEE pour permettre, entre autre, de disposer d'au moins un an de données.

Nous présentons dans ce rapport une tentative de formalisation du protocole du réseau de surveillance, dont la finalisation revient à Harena (partie de sa thèse), en étroite collaboration avec ses encadrants (R. Lancelot et V. Chevalier), M. Jourdan et les partenaires du réseau : SV nationaux et régionaux y compris LNDV, ainsi que les VS et ACSA du lac Alaotra, et les virologistes du CIRAD et du FOFIFA.

2.2.1. Surveillance des foyers de pestes aviaires

2.2.1.1. Objectifs

Les objectifs spécifiques de cette activité seraient de :

- i) mettre en place un réseau de surveillance des suspicions d'IA et de MN dans les élevages et sur les marchés du lac, impliquant les ACSA et les vétérinaires sanitaires de la zone pour identifier les foyers de suspicions de ces maladies ;
- ii) confirmer les foyers à l'aide de prélèvements et de tests de diagnostic virologique, et réaliser des enquêtes « amont et aval » pour déterminer l'origine de l'introduction du virus, et identifier les villages susceptibles d'être victimes de foyers secondaires ;
- iii) tracer la circulation des virus en fonction du renseignement des questionnaires de ces enquêtes « amont et aval », et en fonction des nœuds identifiés dans le modèle de réseau social mis en place par Harena dans la première partie de sa thèse ;
- iv) évaluer la diversité virale et l'évolution des souches de virus IA ou MN dans l'espace et dans le temps.
- v) Dans le cadre d'enquêtes cas-témoin dans les foyers confirmés d'IA et de MN, mettre en évidence des facteurs de risques d'occurrence d'un foyer : confirmation des hypothèses de facteurs de risque faites dans la première partie du travail de thèse d'Harena.

2.2.1.2. Définition des suspicions d'IA ou de MN

La définition proposée pour les suspicions semble pertinente pour repérer des foyers typiques d'IA hautement pathogène (IAHP) ou de MN à virus vélogène :

- CAS 1- Atteinte des poulets de 2 élevages ou plus dans un même village.
 - Dans un élevage atteint, au moins la moitié des oiseaux sont malades ou morts
 - Les symptômes suivants sont observés :
 - Abattement et plumes ébouriffées + torticolis et déséquilibre chez certains poulets
 - Mort rapide (<4 jours) de certains animaux
- OU**
- Abattement et plumes ébouriffées + diarrhée et/ou problèmes respiratoires chez certains animaux
- Mort rapide (<4 jours) de certains animaux
- CAS 2 - Mortalité importante et rapide (<4 jours) de palmipèdes (la moitié du cheptel de palmipèdes) dans un village

Les signes cliniques retenus sont pertinents. Toutefois, le seuil de 50% d'animaux malades ou morts est élevé si l'objectif d'identification de la diversité des virus est maintenu. Ce seuil avait été retenu pour limiter le nombre de foyers à enquêter et la charge de travail de terrain et de laboratoire. Il risque d'éliminer les foyers dus à des souches de virus mésogènes de MN, ou faiblement pathogènes d'IA. Il semblerait pertinent de fixer un seuil plus bas dans un premier temps, quitte à le relever ensuite, ou mieux, d'échantillonner les foyers à enquêter selon une démarche épidémiologique (cf. paragraphe 2.2.1.5). Un seuil de 25 à 30% de morbidité ou mortalité devrait suffire à déclencher une suspicion. En conséquence, nous proposons une modification de cette définition pour une suspicion d'IA ou de MN, dans le contexte de petits élevages familiaux de quelques têtes à quelques dizaines de têtes de poulets (cas 1 ci-dessus) :

- Dans un élevage atteint, au moins un oiseau mort observé pendant au moins trois jours consécutifs, ou mortalité brutale (< 2 jours) d'au moins 25 à 30% de l'effectif total.

Les autres parties de la définition restent inchangées.

2.2.1.3. Déclaration des foyers

Il conviendrait de formaliser le schéma conduisant à la déclaration d'un foyer. Il pourrait se présenter comme suit (Fig. 1) :

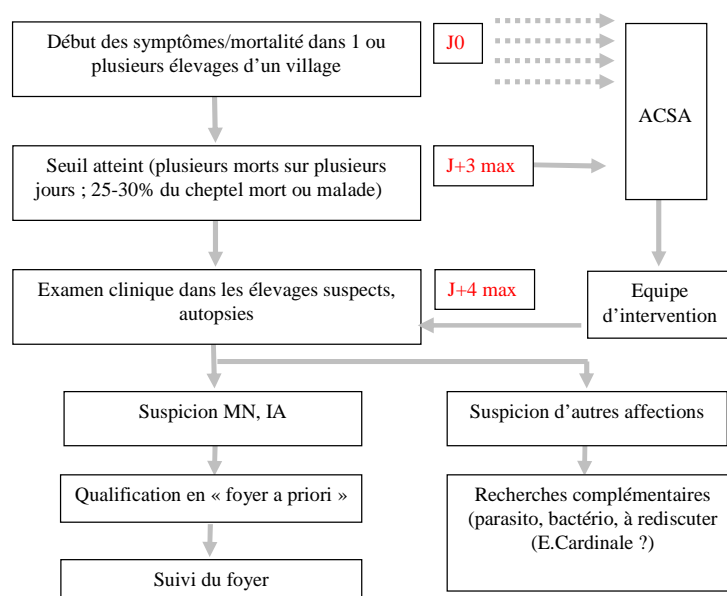


Fig. 1. Processus de suspicion et de déclaration d'un foyer d'IA ou de MN

Un « foyer *a priori* » s'entend comme une unité épidémiologique (élevage isolé, élevages contigus d'un même village, animaux d'un collecteur...) présentant des signes d'appel épidémiologique (morbidité et mortalité telles que décrites ci-dessus dans les cas 1 et 2), dans laquelle les animaux atteints présentent les signes cliniques et les caractéristiques nécropsiques compatibles avec l'IA et la MN.

2.2.1.4. Suivi des « foyers *a priori* »

- Questionnaires d'enquête

Quelques éléments ont semblé intéressants à ajouter tels que :

- la pratique de la vaccination contre la MN,
- la mixité des espèces au sein d'un même élevage.

Le questionnaire peut être utilisé pour tous les foyers. Des enquêtes « amont et aval » seront réalisées sur la base des liens épidémiologiques identifiés. Dans les foyers aval les mêmes questionnaires seront utilisés. Il est de première importance de standardiser la récolte des données à partir des questionnaires entre les différents enquêteurs.

- Prélèvements et échantillonnage

Dans chaque foyer enquête concernant de nombreuses exploitations (10 et plus), il faut **recenser** les élevages atteints et non atteints et essayer d'identifier **l'élevage index**, c'est-à-dire celui où le premier cas suspect a été signalé.

Pour identifier et isoler des virus (MN, IA) et mettre en évidence une variabilité virale (co-infection, évolution virale), il est nécessaire de prélever plusieurs animaux par élevage atteint, et plusieurs élevages atteints par village (classé ici en « foyer *a priori* » selon la Fig. 1 et la définition donnée). Les animaux des espèces atteintes (individus avec signes cliniques) seront prélevés, ainsi que des animaux contacts d'espèces non atteintes, s'il y en a : palmipèdes, par exemple. En effet, les palmipèdes, moins sensibles que les poulets au virus de la MN et de l'IA, peuvent être infectés sans montrer de signe clinique. Il est important de savoir s'ils sont excréteurs de virus, et si oui, de quelles souches.

Sur la base du protocole existant et des discussions intervenues pendant la mission, un protocole du type suivant pourrait être proposé, notamment sur la nature et la quantité des prélèvements à effectuer :

- **Choix de 5 élevages atteints** : le cas index + 4 autres élevage en lien épidémiologique avec ce cas index. Si le village est étendu et présente beaucoup plus de 5 élevages atteints, sélectionner des élevages répartis géographiquement dans le village.

Remarques :

- Si le nombre d'élevages atteints >> 10, réfléchir à l'opportunité de prélever plus de 5 élevages, dans un souci d'évaluer correctement la variabilité des virus présents.
- Choisir de préférence des élevages disposant au moins d'une vingtaine de têtes en prévision d'enquêtes ultérieures.

- **Prélèvements par élevage**

- 5 gallinacés : cadavres en bon état de conservation (fragments de cerveau, trachée / poumon / sac aérien, intestin), ou animaux présentant des signes cliniques : organes si l'euthanasie est possible, sinon écouvillons trachéaux et cloacaux + prise de sang (PS).
- 5 palmipèdes : écouvillons trachéaux et cloacaux si les animaux ne présentent pas de signe cliniques. Si mortalité et/ou signes cliniques : mêmes prélèvements que pour les gallinacés.

Si le temps et les capacités de diagnostic le permettent, il pourrait être intéressant d'augmenter le nombre de prélèvements par élevage (par exemple, sur 10 gallinacés et 10 palmipèdes) pour mieux évaluer la variabilité des virus présents.

Virginie Michel a procédé à une démonstration de PS sur palmipèdes au sinus occipital. La technique a été expérimentée avec succès par Harena, M. Jourdan, Fanja (technicien vétérinaire du Dr Jean) et le Dr Rakotondravao (**Fig. 2**). Elle présente l'intérêt d'une contention plus simple (moins stressante pour les animaux, plus sûre pour l'opérateur, pouvant être faite par le préleveur) et de réalisation plus rapide que les prélèvements à la veine alaire.



Fig. 2. Prise de sang au sinus occipital sur une oie.

- **Périodicité des prélèvements** : effectuer une série de prélèvements dès confirmation d'un « foyer *a priori* », puis toutes les semaines jusqu'à extinction du foyer, en faisant les prélèvements dans les élevages nouvellement infectés.
- **Lors des enquêtes « amont »**, s'il y a toujours présence de cas cliniques dans certains élevages, marchés, ou collecteurs en amont, il est nécessaire de réaliser des prélèvements selon le même principe.
- **Lors des enquêtes « aval »**, si le nœud aval (élevage, village, collecteur,...) présente des animaux avec des signes cliniques et des résultats d'autopsie permettant de le classer comme « foyer *a priori* », il est suivi comme défini précédemment. Si aucun signe clinique n'est décelé et s'il existe un lien épidémiologique fort avec le foyer primaire, effectuer des prélèvements sur les animaux issus du foyer primaires et/ou sur des palmipèdes éventuellement présents, selon les mêmes modalités que décrites ci-dessus.

2.2.1.5. Echantillonnage des foyers

Il est nécessaire de définir comment choisir les foyers à enquêter si ces derniers sont très nombreux. Compte tenu des moyens disponibles (humain, logistique, financier), ils ne pourront pas tous être suivis selon le protocole complet. La conduite à tenir doit être définie selon les objectifs de l'enquête : évaluer les voies d'introduction et de dissémination secondaire, représenter la diversité des virus circulant. Il convient de définir *a priori* quels sont les foyers qui seront suivis de manière complète et que faire pour les autres (**Fig. 3**).

- Il est important d'identifier le cas index et l'enchaînement « en cascade » des élevages atteints, puis d'échantillonner des animaux dans chacun des élevages de même niveau. Une telle cascade est représentée par les foyers F1, F2, F3 et F4 tracés en rouge sur la **Fig. 3**.
- Lors de la sélection des élevages dans lesquels des animaux seront prélevés, il faut privilégier ceux pour lesquels les liens épidémiologiques

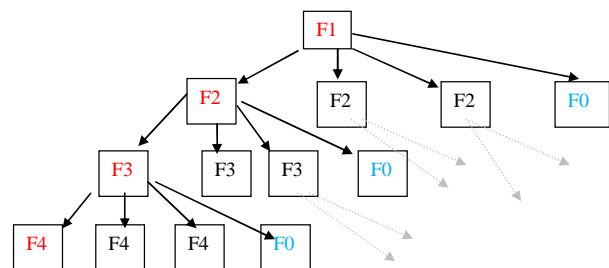


Fig. 3. Exemple fictif d'enchaînement de foyers pour un foyer primaire (F1), avec des foyers en cascade (F2, F3, F4) et des nœuds en lien épidémiologique direct avec les foyers mais sans mortalité ni clinique (F0).

sont les mieux documentés afin d'éviter les erreurs d'interprétation des résultats de séquençage (évolution du génome vs autre souche circulante ou autre voie d'introduction). En pratique, il semble illusoire de vouloir identifier plus de 3-4 « générations » de foyers.

- Pour les autres foyers (en noir sur la **Fig. 3**), s'il n'est pas possible de réaliser tous les prélèvements du suivi complet, effectuer alors dans les élevages en lien épidémiologique clair 10 à 20 prélèvements (écouvillons) pour évaluer la pertinence du réseau.
- Pour les nœuds en lien épidémiologiques direct mais sans signes cliniques (en bleu sur le schéma), il peut s'avérer pertinent de faire quelques prélèvements (10 à 20) afin de vérifier s'il n'y a pas de présence du virus ou si des modifications du phénotype/génotype de la souche peuvent expliquer la diminution du pouvoir pathogène.

Remarque :

Les visites de terrain ont permis de constater que la structuration des élevages est propice à la propagation et à la persistance de la MN et de l'IA (Fig. 1). En effet les élevages familiaux font partie de villages dont les troupeaux fréquentent les mêmes parcours pendant la journée (divagation dans le village pour les *Gallus*, sur les rizières et zones humides pour les palmipèdes). Ainsi, des espèces de sensibilités différentes pour la MN et l'IA et des individus d'âges différents se côtoient dans la journée et parfois la nuit dans les mêmes poulaillers. Les densités de populations sont assez faibles en journée (extensif) mais peuvent être assez élevées la nuit, en claustration. Il est souvent difficile de distinguer des unités épidémiologiques à l'intérieur d'un village.

Les collecteurs qui achètent des volailles pour les revendre dans des marchés, et les marchés eux-mêmes, sont des zones de brassage ou sont mélangés puis dispatchés des volailles d'espèces, d'âges, de provenance et de statut vaccinal (et donc de microbisme) différents. Dans le cadre de la pérennisation d'un système de surveillance au delà du projet actuel, les collecteurs et les marchés sont être des points à surveiller particulièrement. L'approche qui consiste à enquêter les nœuds identifiés lors de l'analyse des réseaux sociaux effectuée par Harena dans la première partie de sa thèse, en plus de ceux identifiés lors des enquêtes amont et aval est pertinente pour la validation du réseau.

2.2.1.6. Analyses de laboratoire

Les analyses réalisées seront principalement virologiques (RT-PCR et isolement). Tous les prélèvements ne sont pas forcément à analyser dans un premier temps. La sérologie (ELISA MN et IA, permettant le typage A pour ce dernier) viendrait en secours en cas de virologie négative, ou comme complément d'information sur le statut immunitaire des animaux (Valablement vaccinés ? Ayant survécu à un premier contact avec le virus ?). **Il convient de définir précisément ce qui peut être fait.**



Fig. 4. Conditions d'élevage des oiseaux domestiques au lac Alaotra. De haut en bas : parcours sur rizière, poulailler et commercialisation.

2.2.1.7. Gestion et traitements des données

Il est en fondamental que les prélèvements soient identifiés de façon fiable et pérenne, et que le lien avec les foyers en amont, et les résultats virologiques ou sérologiques en aval puisse être établi facilement et avec certitude. **Il en va de la qualité et de la fiabilité de l'ensemble des résultats de l'enquête.** Le tandem Marion-Harena s'est proposé pour concevoir et développer la base de données devant gérer l'ensemble des données. Il est souhaitable que cette base de données soit testée et validée par un informaticien expérimenté. Nous suggérons que cette étape de validation soit effectuée par D. Chavernac (UMR15).

2.2.2. Animation du réseau / formation / restitution

Pour son bon fonctionnement, le réseau nécessite la collaboration active des partenaires locaux (ACSA, maires ou chefs de fokontany, VS, services vétérinaires...). Leur implication effective est cruciale pour assurer le succès du réseau et sa pérennisation. L'animation est très importante et doit se manifester par de la formation et de l'information : plusieurs demandes des vétérinaire de terrain ont été faites en ce sens, ainsi que de la part des services vétérinaires régionaux. Ces animations doivent être l'occasion d'impliquer les VS et services vétérinaires centraux, y compris le Laboratoire national de diagnostic vétérinaire. Il faut les préparer à l'avance et profiter de la venue d'experts nationaux ou régionaux pour maintenir et renforcer l'intérêt.

A titre d'exemple, des formations pourraient être organisées pour les ACSA et les vétérinaires sur AI et MN : réunions, formation à l'autopsie et aux prélèvements, distribution de support d'aide à la décision (fiche plastifiée par exemple). Des formations pourraient être également organisées sur les autres dominantes pathologiques qui auront été identifiées : aide au diagnostic, protocoles de traitement et de prévention...

La restitution des résultats est une étape normale et un **objectif prioritaire** du travail. Elle doit être faite dans des délais raisonnables sous peine de compromettre la pérennisation du réseau, voire même l'accès aux élevages sur le terrain. **Ces animations, formations et restitutions ont un coût qui doit être évalué et budgété.**

2.2.3. Biosécurité

La réalisation d'enquêtes d'intervention sur foyer (de surcroît en lien avec des suivis hors foyer) impose le respect strict de règles de biosécurité. Ces dernières, pas forcément très aisées à mettre en œuvre dans les conditions du terrain, ont été discutées avec l'équipe.

2.2.3.1. Prévention de la dissémination des agents pathogènes

Les principaux vecteurs qui pourraient permettre la dissémination des agents pathogènes concernés sont les **véhicules** (voitures, motos, vélos...) et les chaussures souillées. Il serait opportun de

- 1) Porter des pédisacs lors des enquêtes sur foyers
- 2) Garer le véhicule à l'extérieur du village
- 3) Laver le véhicule (y compris roues et bas de caisse) tous les soirs.
- 4) Le véhicule doit être passé au désinfectant administré à l'aide d'un pulvérisateur à l'arrivée et au départ du foyer.
- 5) Les matériels de prélèvement (glacières, trousse, ...) doivent être désinfectés (gel, lingettes...).

2.2.3.2. Qualité des prélèvements

Trois jeux complets de matériel d'autopsie doivent être disponibles. Chaque jeu utilisé doit être désinfecté et rincé sur place pour permettre des prélèvements avec du matériel propre pour chaque animal.

2.2.3.3. Sécurité des personnes

Les virus vélogènes de la MN, et hautement pathogènes de l'IA sont des zoonoses (conjonctivites, voire atteintes plus graves pour IAHP). D'autres agents pathogènes zoonotiques sont susceptibles d'être présents dans les animaux prélevés ou autopsiés : virus West Nile très fréquent à Madagascar, et nombreux autres arbovirus, bactéries (*Chlamydia* spp., *Mycobacterium* spp., etc.), parasites... Le port de gants et masques lors des autopsies est indispensable et doit être effectivement respecté.

2.2.4. Identification des circulations virales à bas bruit

L'objectif de cette activité est de caractériser les circulations virales : virus en cause, profils temporels et variations selon l'environnement (strates). Le plan d'observation envisagé jusqu'à présent prévoit de réaliser des enquêtes dans 3 strates environnementales différenciées par des proportions et natures différentes des zones humides : (1) lac Alaotra, (2) mosaïque de rizières et tanety (collines), et (3) tanety, supposées de risque décroissant vis-à-vis de la transmission des virus de l'IA, voire de MN.

Pour atteindre cet objectif, il est envisagé d'échantillonner des animaux (non identifiés individuellement) dans les mêmes élevages à intervalles de 3 mois pendant au moins un an. Trois cents animaux doivent être examinés dans chaque strate à chaque passage (900 animaux par passage), et chaque animal devait faire l'objet d'une prise de sang pour sérologies IA et MN, et d'un écouvillonnage trachéal et cloacal, soit 1.800 sérologies et 1.800 écouvillonnages par passage. L'effectif de 300 animaux a été défini pour permettre la mise en évidence de différences de prévalence sérologique instantanée d'au moins 10% entre chaque strate, sur la base d'une prévalence sérologique instantanée de 40% dans la strate la plus exposée. Pour limiter le coût et surtout la charge de travail de virologie, les écouvillons ne doivent faire l'objet de test RT-PCR pour recherche du génome viral qu'en cas de séroconversions massives révélées par les tests ELISA.

Compte tenu des moyens humains et matériels disponibles, ce protocole nous semble difficile à réaliser de front avec les enquêtes sur foyer. Ces dernières nous semblent prioritaires dans la mesure où elles vont donner un éclairage complémentaire aux enquêtes sérologiques et virologiques transversales déjà effectuées, en se focalisant sur les virus pathogènes présentant de forts enjeux économiques, voire de santé publique. Elles sont de plus indispensables pour confirmer l'hypothèse de transmission virale selon les filières, à la base de la thèse d'Harena.



Fig. 5. Lac Alaotra et site d'Anororo (zone cerclée de rouge)

La détection de souches virales circulant à bas bruit est cependant importante à mettre en œuvre, pour répondre aux questions de biodiversité des virus (notamment IAFP), d'écologie des communautés de virus et d'oiseaux (domestiques, commensaux et sauvages), y compris la compréhension de phénomènes d'émergence.

En conséquence, nous proposons de donner la priorité à la détection de virus IA faiblement pathogènes, selon les aménagements suivants :

1. Se limiter à la strate où la circulation observée en IA a été la plus intense, à savoir le lac Alaotra, et plus précisément le site d'Anororo (**Fig. 5**).
2. Augmenter la fréquence des passages, tous les deux mois par exemple, ce qui permettrait d'avoir une idée plus précise des pics éventuels de circulation virale, et augmenterait les chances d'isoler du virus (primo-infection, immuno-compétence pas complètement installée).
3. Echantillonner des jeunes animaux (oies, canards) de plus d'un mois (élimination des anticorps maternels et installation de l'immunité¹) et de moins de 3 mois, pour repérer les primo-infections. Dans les conditions d'élevage intensives, un canard de barbarie de 2 mois pèse de 2 à 3 kg^{2,3}. La croissance des palmipèdes dans les conditions extensives malgaches est certainement plus lente, mais la taille des animaux de 2 à 3 mois ne devrait pas poser de problème pour les prélèvements sanguins et les écouvillonnages cloacaux et trachéaux. Nous recommandons toutefois d'évaluer la relation allométrique taille – poids en réalisant une enquête sur des animaux d'âge connu (oies, canards, en distinguant les phénotypes éventuels) : relever l'âge et le poids, éventuellement le sexe, et estimer une courbe de croissance à l'aide de régression linéaire ou non linéaire (voir avec R. Lancelot pour ces aspects statistiques).
4. Limiter la taille de l'échantillon à une centaine d'animaux. Cette taille permet une bonne précision de la prévalence sérologique instantanée : $IC_{95\%} = [40 ; 60]$ pour $p = 50\%$, c'est-à-dire dans la plus mauvaise situation concernant la précision. Elle peut être majorée (200 ou 300 animaux, par exemple), si on souhaite augmenter les chances d'isolement de virus.

¹ Liu, S.S. & Higgins, D.A. 1990. Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 97: 637-644.

² Salichon, Y. 1990. Quelques caractéristiques de la production du Canard de Barbarie en France. Options Méditerranéennes, série A, 1990(7): 117-125.

³ Romboli, I. 1990. Quelques données sur l'élevage extensif du Canard de Barbarie. Options Méditerranéennes, série A, 1990: 127-137.

2.3. Sujet possible de collaboration CIRAD-AFSSA-FOFIFA sur l'épidémiologie des pestes aviaires à Madagascar

A l'issue de la mission, une nouvelle collaboration en épidémiologie semble envisageable sur **l'épidémiologie moléculaire de la MN, voire de l'IA** (selon circulations virales observables sur le terrain). Il pourrait s'agir d'utiliser la mesure de l'évolution du génome viral lors des passages d'espèces (palmipèdes ↔ *Gallus*), et d'un animal à l'autre dans une même espèce, pour mieux comprendre les dynamiques épidémiologiques.

Les analyses virologiques préliminaires (RT-PCR) seraient effectuées à Madagascar (DRZV). Les aspects relatifs à l'évolution du génome viral seraient pilotés par l'équipe de virologie de l'UMR15, en collaboration avec le DRZV et l'unité de virologie de l'AFSSA (VIPAC). La faisabilité de cette étude – et la pertinence de mettre un étudiant en thèse sur ce sujet – seront évaluables en analysant les succès et difficultés de l'enquête de surveillance qui débute actuellement (novembre 2009).

Concernant les aspects épidémiologiques, un échantillonnage complexe devra être mis en œuvre, associé à des capacités de diagnostic à haut débit et de caractérisation fine du génome viral (séquençage) :

- Par espèce : canard, oie, poule / poulet ;
- Par foyer : à l'aide d'enquête épidémiologique détaillée, identification des séquences de transmission d'un élevage à l'autre et réalisation de prélèvements permettant de caractériser finement les virus circulant et l'évolution de leur génome ;
- Dans l'environnement, pour rechercher les virus dans l'eau et les boues, milieu de vie des palmipèdes pendant la journée. Cet aspect serait important à prendre en considération compte tenu de l'omniprésence de l'eau, des rizières et des zones humides dans cette partie de Madagascar (**Fig. 6**). Il est maintenant bien établi que l'eau et les boues peuvent servir de réservoir des virus IA et MN.

Des modèles mathématiques de transmission intra-espèce (oie, canard, poule...) seraient développés et couplés pour représenter la transmission inter-espèce, et au final, la diffusion du virus dans un système multi-espèce et multi-âge comme cela est souvent rencontré à Madagascar.

Cette étude nécessiterait la mise en place de collaborations franco-malgaches fortes entre épidémiologistes, virologistes, spécialistes de l'évolution des génomes viraux et modélisateurs. Il conviendra d'identifier soigneusement les points critiques et les moyens de les aborder avant de lancer l'étude : fréquence des foyers et capacité de surveillance / échantillonnage associée, recherche des virus IA et MN dans des eaux et boues telles que rencontrées à Madagascar (matières minérales et organiques dissoutes et en suspension), capacités de diagnostic / séquençage, compétences pointues en modélisation, etc.



Fig. 6. Oies et canards aux environs d'Ambatondrazaka

Remerciements

Nous remercions chaleureusement l'ensemble des partenaires rencontrés pour leur aide et leur disponibilité de tous les instants et tout particulièrement Harena et Marion.

3. Annexes

3.1. Déroulement de la mission

- 01/11/2009 : arrivée à Antananarivo
- 02/11/2009 : réunions de travail et visites du DRZV et de la DR du CIRAD, discussion avec un accoureur et aviculteur de la filière avicole moderne
- 03-05/11/2009 : visites de terrain à Ambatondrazaka et dans la région Est du lac Alaotra : visites d'élevage et de marchés, réunion aux services vétérinaires régionaux, réunion avec des agents communautaires de la santé animale (ACSA) et des vétérinaires sanitaires
- 06/11/2009 : restitutions à chaud avec les services vétérinaires, la DR du CIRAD et le SCAC d'Antananarivo

3.2. Liste des personnes rencontrées

3.2.1. Antananarivo

Dr Rakotondravao	Chef de département DRZV
Dr Harentsoaniaina Rasamoelina	Etudiant DRZV en thèse d'épidémiologie
Andriamanivo (Harena)	
Dr Marion Jourdan	VI CIRAD affectée au DRZV, basée à Ambatondrazaka
Mme Yvonne	Directrice scientifique du FOFIFA : réunion prévue mais annulée pour indisponibilité de la DS.
Dr Raymond	Coordinateur du CNLPGA (comité nationale de lutte et de prévention de la grippe aviaire)
Dr Lalao Bibiasa	Adjointe du Dr Raymond
Dr Rakotosamimanana Josoa	Président de l'Ordre National des Vétérinaires malgaches, CVO
Dr Lanto Tiana Razafimanantsoa	Directrice des services vétérinaires
Dr Petera	Responsable de la surveillance épidémiologique de la DSV, coordinateur du TCP sur la FVR (FAO)
Dr Iharimanana	Chef du service santé animale de la DSV
Pascal Danthu (CIRAD)	DR CIRAD par intérim (conversations téléphoniques)
Mme Chabot	Conseiller culturelle adjointe au SCAC d'Antananarivo (conversation téléphonique)
Dr J.-F. Dayon	Aviculteur (SOPRAMAD)

3.2.2. Ambatondrazaka

Dr Edmondine	VS région sud du lac (Manakambahini)
Dr Jean	VS Ampitatsimo
M. Fanja	Technicien vétérinaire (Dr Jean)
Dr Fara	Chef des SV régionaux Ambatondrazaka
Mme Tatamo	Technicienne du SVR
M. Jacky	ACSA de Tsarahonenana
Mme Nirina	Présidente de l'association des marchands de volaille du marché d'Ambatondrazaka
M. Do	Technicien d'élevage AVSF, formateur des ACSA